

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

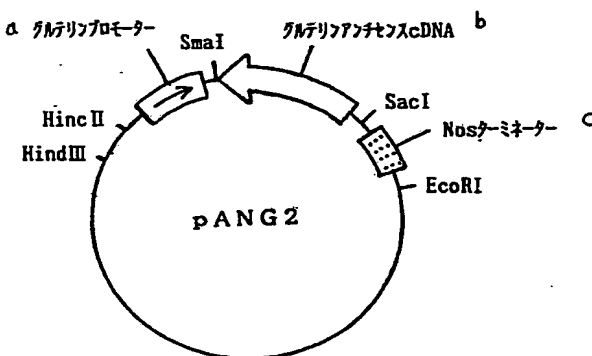


## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A01H 1/00, 5/00, C12N 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO 93/18643  (43) 国際公開日 1993年9月30日 (30.09.1993)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00355 (22) 国際出願日 1992年3月24日 (24. 03. 92)  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 加工米育種研究所 (RICE BREEDING RESEARCH LABORATORIES) [JP/JP] 〒980 宮城県仙台市青葉区南吉成6丁目6番地の3 Miyagi, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 丸田嘉幸 (MARUTA, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.		
添付公開書類		国際調査報告書

(54) Title : PROCESS FOR REDUCING SEED STORAGE PROTEINS AND PROCESS FOR TRANSFORMING PLANTS

(54) 発明の名称 種子貯蔵タンパク質の低減方法および植物の形質転換方法



## (57) Abstract

A process for reducing seed storage proteins by the genetic engineering technique, which comprises introducing into a plant a gene serving as a template for an mRNA of a seed storage protein and transferring the gene in the seed to thereby inhibit the translation of the mRNA of the protein. A process for transforming plants with a vector containing a glutelin promoter and a foreign gene.

(57) 要約

種子中の種子貯蔵タンパク質を遺伝子工学的手法により低減させる方法及び植物の形質転換方法が開示されている。本発明の方法では、種子貯蔵タンパク質の mRNA に対して相補的な塩基配列を有する mRNA の鋳型となる遺伝子を植物に導入し、該遺伝子を種子中において転写させることにより、前記種子貯蔵タンパク質の mRNA の翻訳を阻害して種子中における前記種子貯蔵タンパク質を低減させる。また、本発明の植物の形質転換方法では、グルテリンプロモーター及び外来遺伝子を含むベクターで植物を形質転換する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KZ	カザフスタン	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CI	コート・ジボアール	LK	スリランカ	SU	ソビエト連邦
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TD	チャド
CS	チェコスロヴァキア	MC	モナコ	TG	トーゴ
CZ	チェコ共和国	MG	マダガスカル	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	ML	マリ	US	米国
DK	デンマーク	MN	モンゴル	VN	ベトナム
FI	フィンランド	MR	モーリタニア		
ES	スペイン				

-1-  
明細書

種子貯蔵タンパク質の低減方法および植物の形質転換方法  
産業上の利用分野

本発明は、種子中における貯蔵タンパク質の量を低減させ、低タンパク質種子を得る方法に関する。また、本発明は、植物の形質転換方法に関する。

従来技術

高等植物の種子には乾燥重量当り、豆類では20～30%、穀類では10%程度のタンパク質が含まれている。これらのうち、7～8割を貯蔵タンパク質が占めている。特にイネ種子中に含まれている貯蔵タンパク質は希酸や希アルカリにのみ可溶なグルテリンと呼ばれる成分が約80%を占め、主要な貯蔵タンパク質となっている。残りは、有機溶媒に可溶なプロラミン(10～15%)と、塩で可溶なグロブリン(5～10%)とで構成されている。

種子貯蔵タンパク質は食糧として重要なタンパク質資源であり、栄養学的、タンパク質化学的見地から多くの研究がなされてきた。このため、穀物ではトウモロコシ、コムギ、オオムギ等の貯蔵タンパク質遺伝子がクローニングされ、その遺伝子構造からアミノ酸配列が推定されたり、さらに、遺伝子制御領域が解析されたりしている。

イネ種子貯蔵タンパク質のグルテリンのcDNAは既にクローニングされ、その塩基配列の解析からこのタン

パク質の完全一次構造が決定<sup>-2-</sup>されている。さらに、この cDNA をプローブとして当該タンパク質の遺伝子も単離されている（特開昭 63-91085 号）。

この核由来遺伝子断片の 5' 上流域（-グルテリンプロモーター領域）の機能を明らかにするために、該プロモーターとレポーター遺伝子としてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子との融合遺伝子がアグロバクテリウムを介してタバコに導入された。そして、これら形質転換タバコを用いて CAT アッセイを行った結果、イネグルテリンプロモーターは種子胚乳特異的、かつ、登熟期特異的に発現することが確認された（オキタら、Plant Molecular Biology, 14, 41-50 (1989)）。

ところで、加工好適米はタンパク質含量の低いことが要求されている。醸造用の酒米においては胚乳周辺部に多く存在しているタンパク質を減少させるために精白度を高めることによってその目的を果たしている。米デンプンの製造においては、純度を高めるためにアルカリ、界面活性剤、さらに、超音波の利用によってタンパク質を除去している。

また、米のタンパク質含量はその食味にも影響を与えており、いわゆるおいしい米はタンパク質含量が低い。このような低タンパク質米に対しては、従来の交雑育種法、あるいは、突然変異の誘発を利用した方法が行われてきた。

近年、植物組織培養技術の向上と遺伝子導入技術の開発により形質転換植物の作出が報告されている。イネ科植物においては、培養細胞より単離したプロトプラストをポリエチレングリコールで処理することにより外来遺伝子を導入した例（特開昭63-287485号）や、電気パルスを印加することにより外来遺伝子を導入した例が報告されている（特開平1-181791号）。

また、形質転換イネで外来遺伝子を発現させるプロモーターはその全ての例でカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーターが使われている。

タンパク質の合成の情報となるmRNAのようなある機能を持ったRNAに対して相補的塩基配列を持つRNAがそのRNAの機能を抑制する働きがあることが知られている。これはアンチセンスRNAと総称されるものであり、遺伝子組換え技術の導入によって、アンチセンスRNAを人工的に作り出す研究も進められている。

例えば、花色色素合成に関与しているチャルコン合成酵素のアンチセンスRNAを産生する組換えペチュニアを作製し、野生型とは花色の異なるペチュニアが得られている（欧州特許公開第341885号）。また、トマト果実の軟質化に重要な役割を果たしているポリガラクトロナーゼ遺伝子が導入されたアンチセンスRNAによって発現が抑制され、野生型よりも保存の効くトマトが作り出されている（欧州特許公開第891115号）。

しかし、これまでアンチセンスRNAの技術を種子貯蔵タンパク質の低減に応用した例はない。

米中の胚芽や糠にはタンパク質、脂質、灰分、ビタミンが多く、これらが麹菌や酵母の生育を急進させて酒質の調和を崩し、また、醸造酒の着色、雑味成分となって、酒質を劣化させている。従って、精米によってこれら有害成分を取り去っている。そして、とう精するにつれ、糠にその含量の多い脂質、灰分及びグロブリンは大きく減少するが、逆に、米の貯蔵タンパク質であるグルテリンやプロラミンは胚乳内部にも存在するため、その組成比が増加してしまう。

ところで、酒米の育種は現在、早生、短稈化を目標に行われているが、一般に、早生、短稈品種はタンパク質含量が高く、早生、短稈でかつ、画期的な低蛋白性を有する品種の育成は従来の技術では極めて困難である。さらに、突然変異の誘発を利用した方法は多大数の植物体を処理する必要がある、その中から低タンパク個体を選抜するには非常に多くの労力と時間を要する。

また、種子貯蔵タンパク質の品質の改善を目指す場合、現存する貯蔵タンパク質を特異的に効率良く低減させる必要がある。

従来、形質転換植物において、外来遺伝子を発現させるためには、通常、CaMVの35Sプロモーターが使われている。

しかし、形質転換イネにおいては、CaMV 35Sプロ

-5-

ロモーターの転写活性は弱く、特に、グルテリン遺伝子が発現している胚乳中では、その転写活性はさらに弱い（シマモトラ、Mol. Gen. Genet. 220: 389-392 (1990)）。このため、グルテリンアンチセンスRNAを作らせるプロモーターとして、CaMV 35Sプロモーターを用いては効率良いグルテリンタンパク質の低減は期待できない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、従来の交雑育種法や突然変異誘発法よりも容易、確実に種子中の貯蔵タンパク質の量を低減させることができる方法を提供することである。

さらに、本発明の目的は、胚乳中等、従来技術において用いられているプロモーターの活性が低くなる組織中であつても高い転写活性を発揮するように植物を形質転換する方法を提供する。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、植物に種子貯蔵タンパク質に対するアンチセンスRNAの鋳型となる遺伝子を導入し、これを種子中で転写させることにより種子貯蔵タンパク質の量を低減させることに成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、種子貯蔵タンパク質のmRNAに対して相補的な塩基配列を有するmRNAの鋳型となる遺伝子を植物に導入し、該遺伝子を種子中において転写させることにより、前記種子貯蔵タンパク質のmRNAの翻訳を阻害して種子中における前記種子貯蔵タンバ

-6-

ク質を低減させる方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の方法により種子貯蔵タンパク質の量が低減された種子を提供する。さらに、本発明は、グルテリンプロモーター及び外来遺伝子を含むベクターで植物を形質転換することを含む植物の形質転換方法を提供する。

本発明により、遺伝子工学的手法により、種子貯蔵タンパク質の量を低減する方法及び貯蔵タンパク質量が低減された種子が提供された。本発明の方法は、従来の交雑育種や突然変異誘発を利用する方法に比べて容易に、かつ、確実に行うことができる。

また、本発明により、従来技術で用いられているプロモーターでは転写活性が低かった胚乳等の組織中でも高い転写活性が発揮され、外来遺伝子が効率良く発現される植物の形質転換方法が提供された。

#### 図面の簡単な説明

図 1 はグルテリンのプロモーターの塩基配列を示す図

図 2 は本発明の実施例においてクローニングされた、グルテリンプロモーター及びグルテリン遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列を示す図、

図 3 は本発明の実施例において、形質転換に用いる組換えプラスミドベクターを作製するために中間体として作製した組換えプラスミドベクターの遺伝子地図、

図 4 及び図 5 は本発明の実施例において、形質転換に



-7-

用いた組換えプラスミドベクターの遺伝子地図、

図 6 及び図 8 は対照の米粒 20 粒のグルテリン量（対グロブリン比）を示すヒストグラム、

図 7 及び図 9 は本発明の方法を適用した米粒 20 粒のグルテリン量（対グロブリン比）を示すヒストグラムである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、種子貯蔵タンパク質の mRNA に対するアンチセンス RNA を種子内において生産させ、種子貯蔵タンパク質の mRNA が翻訳されることを阻止する。

本発明の方法が適用される植物の例としてはイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ダイズ等、貯蔵タンパク質を含む種子を実らせる植物を挙げることができる。また、種子貯蔵タンパク質の例としてグルテリンを挙げることができる。グルテリン遺伝子は既にクローニングされており、その塩基配列も公知であるので、イネのゲノミック DNA ライブラリーから該遺伝子をクローニングする操作は、グルテリンの cDNA をプローブとして用いることにより常法に基づき行うことができる。

グルテリン cDNA を、植物内で複製可能なベクタープラスミドに組み込み、これで植物を形質転換することにより、植物内でグルテリン mRNA に対するアンチセンス RNA を生産することができる。植物内で複製可能なベクタープラスミドはこの分野においてよく知られて

おり、例えば後述の実施例<sup>-8-</sup>では市販の p U C 1 9 (メシ  
ングら、Gene, 33:103-119 (1985)、ファルマシア社より  
市販)を用いている。後述の実施例で示すように、アン  
チセンス R N A の生産量を高めるために、1つのベクタ  
ープラスミド中に、2つ又はそれ以上のグルテリン c D  
N A をアンチセンス方向に挿入することもできる。また  
、植物細胞の形質転換方法自体もこの分野において周知  
であり、例えば、プロトプラストに電圧を印加して外来  
D N A を取り込ませるエレクトロポレーション法、又は  
プロトプラストにポリエチレングリコールを作用させる  
方法により行うことができる。

従来技術の項で述べたが、従来、植物の形質転換にお  
いては、植物内で発現させる外来性遺伝子のプロモータ  
ーとして、C a M V の 3 5 S プロモーターが用いられて  
きた。しかしながら、C a M V の 3 5 S プロモーターは  
、種子内での活性が低く、従って、種子内の貯蔵タンパ  
ク質の低減には不向きである。本願発明者らは、グルテ  
リンのプロモーターが種子内において高い活性を有する  
ことを見出し、該プロモーターを用いて種子貯蔵タンパ  
ク質の低減に成功した。該プロモーターの塩基配列は図  
1 に示す通りであり、グルテリンの構造遺伝子の上流に  
存在する。

植物細胞の形質転換を行う際、アンチセンス方向に挿  
入されたグルテリン c D N A 及びグルテリンプロモータ  
ーを有する組換えベクターの他に、マーカーとして例え

ば薬剤耐性（後述の実施例<sup>-9-</sup>ではハイグロマイシン耐性を利用）を発現する遺伝子を別途導入しておくとし便利である。このようなマーカー遺伝子は形質転換細胞の選択のみ必要であり、選択が終われば不要となるので、グルテリン cDNA を有する前記組換えベクターとは別の組換えベクターに挿入して形質転換することが好ましい。このようなマーカーとなるベクターのプロモーターはグルテリンプロモーターである必要はなく、従来から広く用いられている CaMV の 35S プロモーターでよい。

得られた形質転換プロトプラストを再生し、これを常法により培養して植物体を再生させ、その DNA をサザンハイブリダイゼーション法で調べてグルテリンのアンチセンス遺伝子を有しているものを選択することにより、種子貯蔵タンパク質量が低減された種子及びこのような種子を実らせる植物を得ることができる。

なお、上記説明は、主たる種子貯蔵タンパク質であるグルテリンについて説明したが、上記した方法は他の種子貯蔵タンパク質にも適用可能であり、他の種子貯蔵タンパク質の低減にもグルテリンプロモーターを利用することができる。

また、グルテリンプロモーターは、従来、植物の形質転換に用いられた例がない。従って、本発明はまた、グルテリンプロモーター及び外来遺伝子を含むベクターで植物を形質転換することを含む植物の形質転換方法を初

-10-

めて提供した。この本発明の形質転換方法は、種子貯蔵タンパク質の低減方法に限らず、他の所望の外来遺伝子を種子中又はその他の組織中で発現させるために用いることができるものである。

以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### [実施例]

以下の実施例において、特に断りがない限り、ティ・マニアティス (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982)) 記載の方法により行った。

(1) イネグルテリンの核DNAのクローニング及びグルテリンのプロモーター領域を含む断片の単離 (図3)

イネ栽培品種ササニシキの緑葉から常法に従い核DNAを抽出した (植物遺伝子工学マニュアル: 講談社)。その核DNAをBam HI処理した断片群にEMBL3ファージ (ストラタジーン社製) のBam HI部位に組み込み、さらに、インピトロパッケージング法により遺伝子ライブラリーを作製した。

この遺伝子ライブラリーの中からグルテリンのcDNAをプローブにしてグルテリンに対応する遺伝子を含む組換え体ファージを選抜した。この組換え体ファージよりグルテリンに対応する遺伝子を含む断片を単離精製した後、その遺伝子の塩基配列をサンガーらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463 (1979)) に従い決定した。

決定した塩基配列を図 2 に<sup>-11-</sup>示す。

塩基配列の解析結果より、グルテリンのプロモーター領域を含む断片を制限酵素 Bam HI 及び Spe I で切り出し、3' 末端をエクソヌクレアーゼ III (タカラ社製) で削っていき、グルテリンのプロモーター領域のみを含む断片にした。その 3' 末端に Bam HI リンカーを付加した後、プラスミド pUC19 (上述) の Bam HI 部位へサブクローニングし、プラスミド pUCGP を得た (図 3)。

(2) グルテリンアンチセンス RNA を転写し得るベクターの構築 (図 4、図 5)

上記プラスミド pUCGP において、グルテリンプロモーター領域を含む配列の下流の Sma I 及び Sac I 部位にグルテリンの完全長 cDNA をアンチセンスの方向に挿入した。さらに、アンチセンスグルテリン cDNA 配列の下流の Sac I 及び Eco RI 部位に、ノスターミネーター (グッドマンら、Journal of Molecular and Applied Genetics: 561-573 (1982)) を挿入してグルテリンのアンチセンス遺伝子を保持したプラスミド pANG2 を作製した (図 4)。

さらに、グルテリンプロモーター、アンチセンスグルテリン cDNA 及び ノスターミネーターを含んだ断片を Eco RI 及び Hind III 処理により切り出し、その断片の Eco RI 末端をクレノウ酵素処理により平滑化した後、プラスミド pANG2 の Hind III 及び Hinc II 部位へ挿入

-12-

し、環状化させた。このようにして、グルテリンアンチセンス遺伝子を2個直列に配置させたプラスミド p A N G 3 を作製した (図 5)。

### (3) イネへの形質転換

イネ栽培品種、日本晴及びアキヒカ리를温室で生育させた植物体より莖を採取し、無水エタノール及び次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌処理を行った後、A A 培地 (ミュラーら、Mol. Gen. Genet. 161:67-76 (1978), 2,4-D 1 ppm、カイネチン 0.2 ppm、ジベレリン 0.1 ppm) で振盪培養を 25℃、暗黒、120 rpm の条件下で行い培養細胞を得た。

植え継ぎ4日目の培養細胞を1%セルラーゼRS、1%マセロザイムR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23、0.5%ドリセラーゼ、0.4M マニトール、pH 5.8を含む酵素液で30℃、2時間処理してプロトプラストを調製した。

得られたプロトプラストを0.1%MES、70mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.4M マニトール、pH 5.8を含むバッファーに懸濁した。

この懸濁液にプロモーターとしてCaMV 35S、外来遺伝子としてハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子及びCaMV由来のターミネーターを有するプラスミド 50 µg/ml、並びにグルテリンのアンチセンス遺伝子を有するプラスミド p A N G 2 又は p A N G 3 50 µg/ml を添加し、氷上で5分間冷却

-13-

した後、滅菌したプラスチックセルに移し、直流パルスを  $250 \mu\text{F}$  のコンデンサー、 $625 \text{ V/cm}$  の電圧、 $400 \text{ オーム}$  の抵抗を用いて印加した。

パルス印加後、氷上で20分間冷却した後、R2プロトプラスト液体培地（オオヒラら、Plant Cell Physiol. 14:1113-1121 (1973))で培養を  $25^\circ\text{C}$ 、照明下で行った。

R2液体培地で1～2カ月培養後、 $20 \mu\text{g/ml}$  ハイグロマイシンBを含むN6（チュラ、Scientia Scintifica 18:659-663 (1975))を基本とした増殖固体培地に置床し、ハイグロマイシンに耐性を示すコロニーを選抜した。

1カ月後、このハイグロマイシン耐性コロニーをN6を基本とした再分化固体培地に置床し、明所で1～2カ月間培養を続けると、芽及び根が現われ、やがて幼植物体にまで生育した。

さらに、幼植物体をポットへ移して生育させたところ、成熟した完全なイネ植物体が、日本晴23個体、アキヒカリ10個体得られた。

#### (4) 形質転換の確認

上記(3)で得られた植物体の緑葉より常法に基づいてDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーション法を行い導入した遺伝子の存在を確認した。

その結果、日本晴23個体中、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を保持している植物体

は 20 個体あり、そのうち、<sup>-14-</sup>グルテリンアンチセンス遺伝子をも保持している植物体は 5 個体あった。

また、アキヒカリ 10 個体中、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を保持している植物体は 4 個体で、そのうち、グルテリンアンチセンス遺伝子をも保持している植物体は 2 個体あった。

#### (5) 形質転換イネ植物体の種子の分析

上記(4)でグルテリンアンチセンス遺伝子の保持が確認された植物体を稔実するまで生育させた後、完熟種子を採取した。

その種子を 1 粒ずつ乳鉢で粉砕した後、4 % SDS、6 M 尿素を含むバッファーに懸濁した。その懸濁液を遠心分離した上清を 16 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、さらに、ゲルをクマシーブルーで染色した。染色後のゲルはデンストメーターにかけ、クマシーブルーの染色度合いを数値化し、1 粒ごとにおけるグルテリンの含有量を算出した。

対照として、形質転換していない日本晴及びアキヒカリについてのグルテリン含有量も同様にして算出した。

結果を図 6 ないし図 9 に示す。図 6 は日本晴の対照についての結果、図 7 は本発明の方法により形質転換された日本晴についての結果、図 8 はアキヒカリの対照についての結果、図 9 は本発明の方法により形質転換されたアキヒカリについての結果を示し、これらはランダムに



-15-

選んだ 20 粒の分析結果をヒストグラムで示したものである。なお、グルテリンの含有量は 1 粒中における 26 キロダルトン グロブリン含有量を 1 としたときのグルテリンの含有量で示した。

日本晴の対照のグルテリン含有量の分布において 95 % 信頼区間 ( 6 . 5 ~ 8 . 4 2 ) よりも低い値を示す米粒が日本晴形質転換体には 20 粒中 10 粒あった。これらは環境変異では起こり得ないグルテリン含有量の低減を示すものであることから、グルテリンアンチセンス遺伝子によるグルテリン含有量の低減効果が明らかである。

グルテリンアンチセンス遺伝子を導入した当代の植物体より得られた種子は、形質転換体のヒストグラムでも明らかかなようにグルテリン含有量にばらつきが生じる。これはメンデル遺伝によって種子が F<sub>2</sub> 分離を起こしたためである。

そこで、形質転換日本晴において、グルテリン量の低減の顕著な米粒と変化の見られない米粒、それぞれ 5 粒ずつを選び精度を高めた条件でグルテリン量及びグロブリン量の分析を行った。結果を下記表 1 及び表 2 に示す

-16-

表 1    グルテリンの低減の顕著な米粒（形質転換体）

米粒番号	グロブリン 含量（％）	グルテリン 含量（％）	Glu/Glo*
日本晴 1	12.7	63.9	5.03
日本晴 2	13.8	70.4	5.10
日本晴 3	11.5	60.5	5.26
日本晴 4	12.8	61.7	4.82
日本晴 5	11.2	56.6	5.05
平均	12.4	62.6	5.05

\* : グルテリン / グロブリン

-17-

表 2      グルテリンの低減の見られない米粒  
             (形質転換体)

米粒番号	グロブリン 含量 (%)	グルテリン 含量 (%)	Glu/Glo*
日本晴 6	12.1	76.5	6.32
日本晴 7	12.0	80.7	6.73
日本晴 8	11.8	80.5	6.82
日本晴 9	12.6	75.7	6.01
日本晴 10	11.3	80.9	7.16
平均	12.0	78.9	6.61

\* : グルテリン / グロブリン

また、アキヒカリ対照のグルテリン含有量の分布においても 95% 信頼区間 (9.14 ~ 13.02) よりも低い値を示す米粒がアキヒカリ形質転換体には 24 粒中 10 粒あった。同様に、アキヒカリにおいてもグルテリンアンチセンス遺伝子によるグルテリン含有量の低減効果が明らかである。

さらに、形質転換アキヒカリにおいて、日本晴の場合と同様、グルテリンの低減の顕著な米粒と変化の見られない米粒、それぞれ 5 粒ずつを選び精度を高めた条件下で分析を行った。結果を表 3 及び表 4 に示す。

-18-

表 3 グルテリンの低減の顕著な米粒（形質転換体）

米粒番号	グロブリン 含量（％）	グルテリン 含量（％）	Glu/Glo*
アキヒカリ 1	11.6	59.9	5.16
アキヒカリ 2	11.7	60.7	5.19
アキヒカリ 3	10.2	56.1	5.50
アキヒカリ 4	11.6	58.7	5.06
アキヒカリ 5	10.9	62.8	5.76
平均	11.2	59.6	5.33

\* : グルテリン / グロブリン

-19-

表 4    グルテリンの低減の見られない米粒  
          (形質転換体)

米粒番号	グロブリン 含量 (%)	グルテリン 含量 (%)	Glu/Glo*
アキヒカリ 6	8.9	69.3	7.79
アキヒカリ 7	8.7	71.9	8.26
アキヒカリ 8	8.0	70.8	8.85
アキヒカリ 9	8.0	63.1	7.89
アキヒカリ 10	8.3	67.0	8.07
平均	8.4	68.4	8.17

\* : グルテリン / グロブリン

-20-  
請求の範囲

1. 種子貯蔵タンパク質の mRNA に対して相補的な塩基配列を有する mRNA の鋳型となる遺伝子を植物に導入し、該遺伝子を種子中において転写させることにより、前記種子貯蔵タンパク質の mRNA の翻訳を阻害して種子中における前記種子貯蔵タンパク質を低減させる方法。
2. 前記植物がイネである請求の範囲第 1 項記載の方法。
3. 前記種子貯蔵タンパク質がグルテリンである請求の範囲第 2 項記載の方法。
4. 前記遺伝子の転写は、グルテリンのプロモーターを利用して行なわれる請求の範囲第 1 項ないし第 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。
5. p A N G 2 又は p A N G 3 で植物を形質転換することにより行われる請求の範囲第 4 項記載の方法。
6. 請求の範囲第 1 項ないし第 5 項のいずれか 1 項に記載された方法により種子貯蔵タンパク質が低減された種子。
7. グルテリンプロモーター及び外来遺伝子を含むベクターで植物を形質転換することを含む植物の形質転換方法。

10	20	30	40	50	60
GTTAATCATG	GTGTAGGCAA	CCCAAATAAA	ACACCAAAAT	ATGCACAAGG	CAGTCTGTTG
70	80	90	100	110	120
TATTCTGTAG	TACAGACAAA	ACTAAAAGTA	ATGAAAGAAG	ATGTGGTGTT	AGAAAAGGAA
130	140	150	160	170	180
ACAATATCAT	GAGTAATGTG	TGAGCATTAT	GGGACCACGA	AATAAAAAGA	ACATTTTGAT
190	200	210	220	230	240
GAGTCGTGTA	TCCTCGATGA	GCCTCAAAAG	TTCTCTCACC	CCGGATAAGA	AAACCTTAAG
250	260	270	280	290	300
CAATGTGCAA	AGTTTGCATT	CTCCACTGAC	ATAATGCAAA	ATAAGATATC	ATCGATGACA
310	320	330	340	350	360
TAGCAACTCA	TGCATCATAT	CATGCCTCTC	TCAACCTATT	CATTCTACT	CATCTACATA
370	380	390	400	410	420
AGTATCTTCA	GCTAAATGTT	AGAACATAAA	CCCATAAGTC	ACGTTTGATG	AGTATTAGGC
430	440	450	460	470	480
GTGACACATG	ACAAATCACA	GACTCAAGCA	AGATAAAGCA	AAATGATGTG	TACATAAAAC
490	500	510	520	530	540
TCCAGAGCTA	TATGTCATAT	TGCAAAAAGA	GGAGAGCTTA	TAAGACAAGG	CATGACTCAC
550	560	570	580	590	600
AAAAATTAC	TTGCCTTTCG	TGTCAAAAAG	AGGAGGGCTT	TACATTATCC	ATGTCATATT
610	620	630	640	650	660
GCAAAAGAAA	GAGAGAAAGA	ACAACACAAT	GCTGCGTCAA	TTATACATAT	CTGTATGTCC
670	680	690	700	710	720
ATCATTATTC	ATCCACCTTT	CGTGTACCAC	ACTTCATATA	TCATGAGTCA	CTTCATGTCT
730	740	750	760	770	780
GGACATTAAC	AAACTCTATC	TTAACATTTA	GATGCAAGAG	CCTTTATCTC	ACTATAAATG
790	800	810	820	830	840
CACGATGATT	TCTCATTGTT	TCTCACAAAA	AGCATTCAGT	TCATTAGTCC	TACAACAAC

2/5

```

      10      20      30      40      50      60
GTTAATCATG GTGTAGGCAA CCCAAATAAA ACACCAAAT ATGCACAAGG CAGTCTGTTG

      70      80      90     100     110     120
TATTCTGTAG TACAGACAAA ACTAAAAGTA ATGAAAGAAG ATGTGGTGTT AGAAAAGGAA

     130     140     150     160     170     180
ACAATATCAT GAGTAATGTG TGAGCATTAT GGGACCACGA AATAAAAAGA ACATTTTGAT

     190     200     210     220     230     240
GAGTCGTGTA TCCTCGATGA GCCTCAAAAG TTCTCTCACC CCGGATAAGA AACCCTTAAG

     250     260     270     280     290     300
CAATGTGCAA AGTTTGCATT CTCCACTGAC ATAATGCAA ATAAGATATC ATCGATGACA

     310     320     330     340     350     360
TAGCAACTCA TGCATCATAT CATGCCTCTC TCAACCTATT CATTCTACT CATCTACATA

     370     380     390     400     410     420
AGTATCTTCA GCTAAATGTT AGAACATAAA CCCATAAGTC ACGTTTGATG AGTATTAGGC

     430     440     450     460     470     480
GTGACACATG ACAAATCACA GACTCAAGCA AGATAAAGCA AAATGATGTG TACATAAAAC

     490     500     510     520     530     540
TCCAGAGCTA TATGTCATAT TGCAAAAAGA GGAGAGCTTA TAAGACAAGG CATGACTCAC

     550     560     570     580     590     600
AAAAATTCAC TTGCCTTTTCG TGTCAAAAAG AGGAGGGCTT TACATTATCC ATGTCATATT

     610     620     630     640     650     660
GCAAAAGAAA GAGAGAAAGA ACAACACAAT GCTGCGTCAA TTATACATAT CTGTATGTCC

     670     680     690     700     710     720
ATCATTATTC ATCCACCTTT CGTGTAACAC ACTTCATATA TCATGAGTCA CTTCATGTCT

     730     740     750     760     770     780
GGACATTAAC AAACCTCTATC TTAACATTTA GATGCAAGAG CCTTTATCTC ACTATAAATG

     790     800     810     820     830     840
CACGATGATT TCTCATTTGT TCTCACAAAA AGCATTTCAGT TCATTAGTCC TACAACAACA

     850     860     870     880     890     900
TGGCATCCAT AAATCGCCCC ATAGTTTTCT TCACAGTTTG CTTGTTCCCTC TTGTGCGATG

     910     920     930     940     950     960
GCTCCCTAGC CCAGCAGCTA TTAGGCCAGA GCACTAGTCA ATGGCAGAGT TCTCGTCGTG

     970     980     990    1000    1010    1020
GAAGTCCGAG AGGATGTAGA TTTGATAGGT TGCAAGCATT TGAGCCAATT CGGAGTGTGA

    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GGTCTCAAGC TGGCACAAC T GAGTTCTTCG ATGTCTCTAA TGAGTTGTTT CAATGTACCG

    1090    1100    1110    1120    1130    1140
GAGTATCTGT TGTCGCCCGA GTTATTGAAC CTAGAGGCCT ACTACTACCC CATTACACTA

    1150    1160    1170    1180    1190    1200
ATGGTGATC TCTAGTATAT ATCATCCAAG GTTGTGTAA CAATTTAAGT GCATAATGAA

    1210    1220    1230    1240
TTAATGATTG GCTGCGATAT TTACATTGCT TGTAATTAAC

```

図 2

新たな用紙



3/5

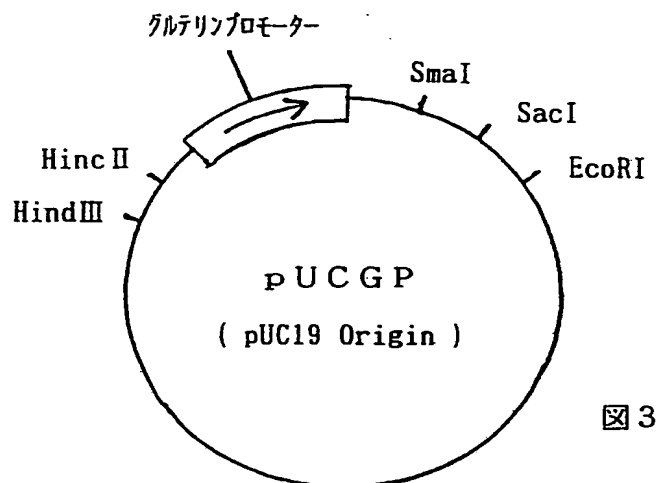


図 3

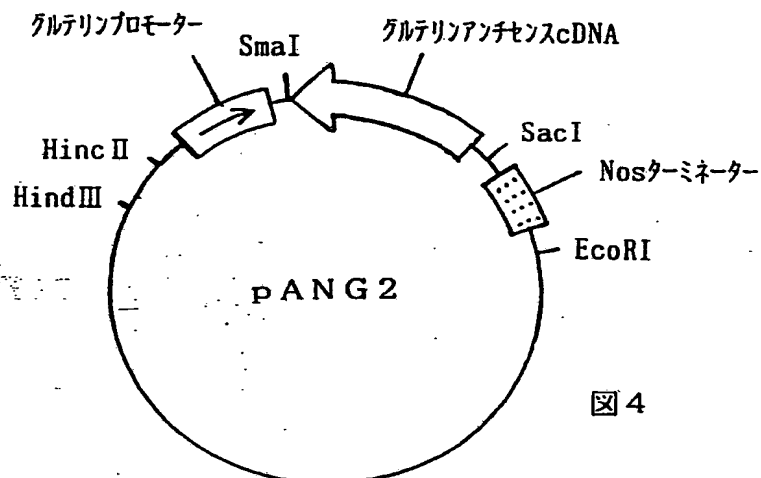


図 4

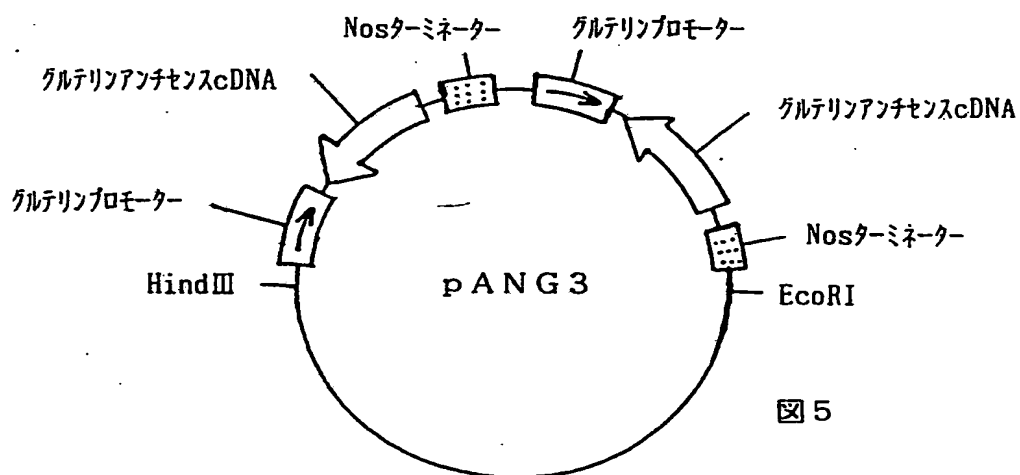


図 5

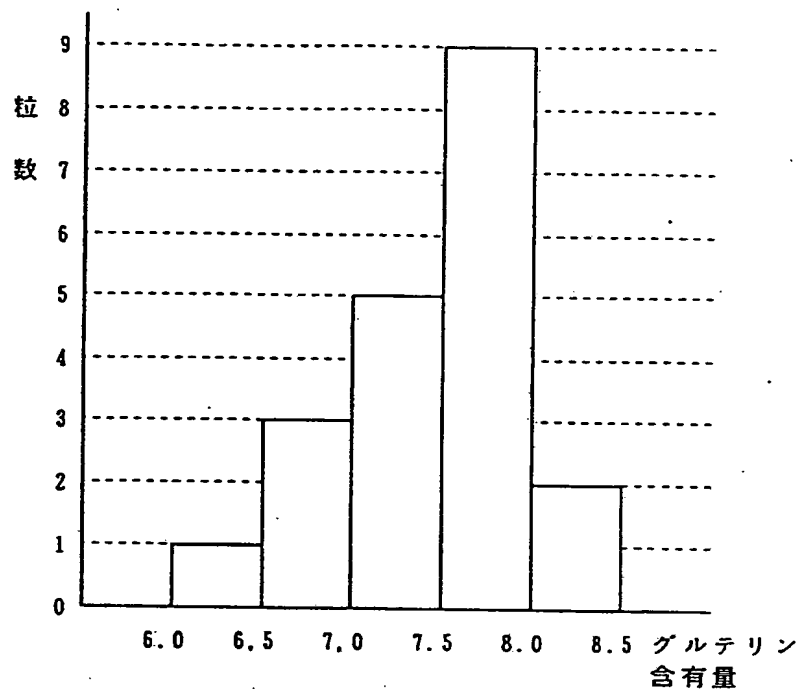


図 6

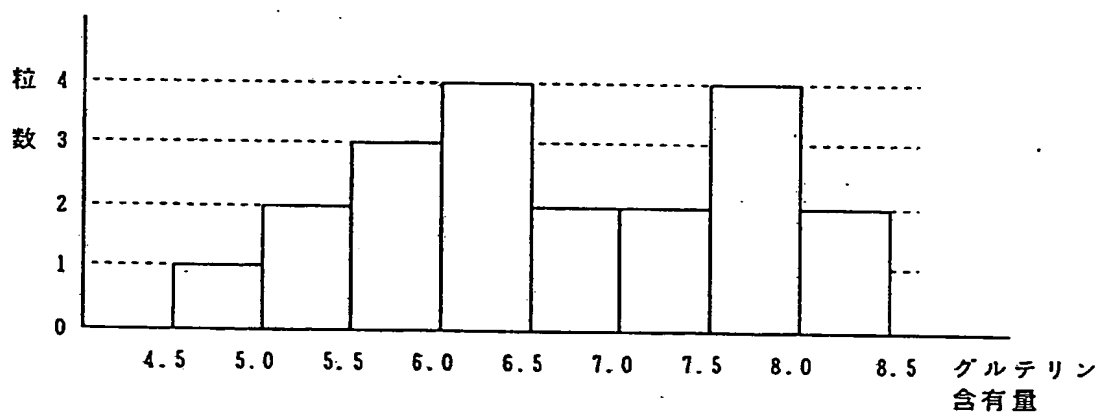


図 7

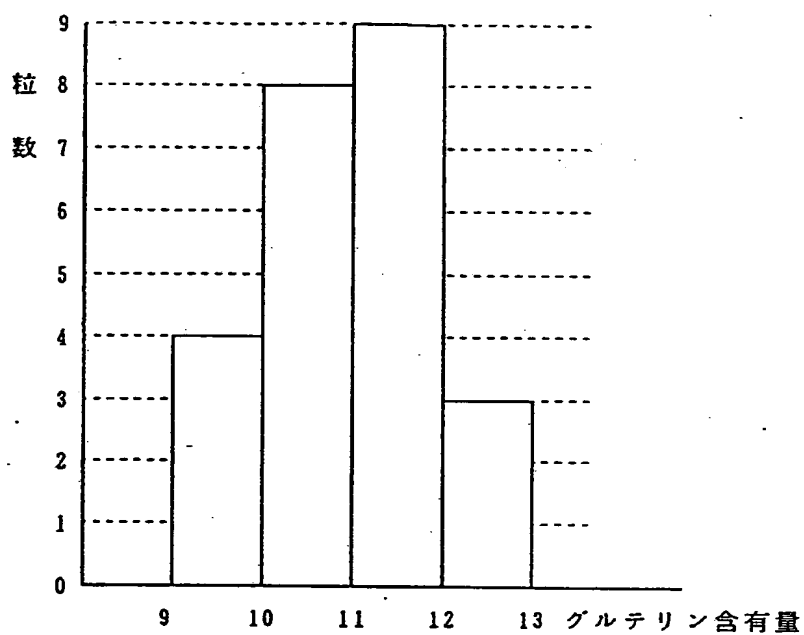


図8

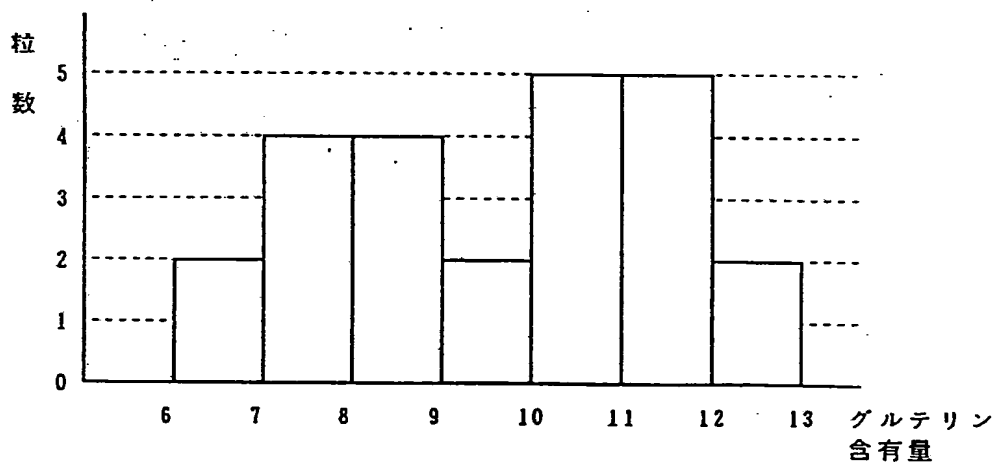


図9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00355

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> A01H1/00, A01H5/00, C12N5/10		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A01H1/00, A01H5/00, C12N5/10	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Commercial Database BIOSIS, JOIS		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	JP, A, 63-91085 (Norin Suisansho Shokuhin Sogo Kenkyusho-cho), April 21, 1988 (21. 04. 88), (Family: none)	1-7
Y	Ramachandran, C.; Ranghavan, V., Journal of Experimental Botany, Vol. 41, No. 225, (1990), p. 393-400	1-7
Y	Bird, C. R. et al., Bio/technology, Vol. 9, No. 7 (1991), p. 635-639	1-7
Y	Smith, C. J. S. et al., Nature, Vol. 334, No. 6184, p. 724-726 (1988)	1-7
Y	Okita et al., Plant Molecular Biology Vol. 14, No. 4, p. 1-50 (1989)	1-7
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
June 2, 1992 (02. 06. 92)		June 16, 1992 (16. 06. 92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号 PCT/JP 92/00355

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl.</b> <b>A 01 H 1 / 00,    A 01 H 5 / 00,    C 12 N 5 / 10</b>		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
<b>IPC</b>	<b>A 01 H 1 / 00,    A 01 H 5 / 00,    C 12 N 5 / 10</b>	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
<b>商用データベース    BIOSIS, JOIS</b>		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名    及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
<b>Y</b>	<b>JP, A, 63-91085 (農林水産省食品総合研究所長)</b> <b>21. 4月. 1988 (21. 04. 88), (ファミリーなし)</b>	<b>1-7</b>
<b>Y</b>	<b>Ramachandran, C.; Banghavan, V., Journal of Expe-</b> <b>rimental Botany, Vol. 41, No. 225, (1990)</b> <b>p. 393-400</b>	<b>1-7</b>
<b>Y</b>	<b>Bird, C. R., et. al., Bio/technology, vol. 9 No. 7</b> <b>(1991) p. 635-639</b>	<b>1-7</b>
<b>Y</b>	<b>Smith, C. J. S., et. al., Nature, vol. 334, No. 6184</b> <b>P. 724-726 (1988)</b>	<b>1-7</b>
<b>Y</b>	<b>Okita, et. al., Plant Molecular Biology</b> <b>vol. 14, No. 4, P. 1-50 (1989)</b>	<b>1-7</b>
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
<b>02. 06. 92</b>	<b>16.06.92</b>	
国際調査機関	権限のある職員	<b>2 B 8 5 0 2</b>
<b>日本国特許庁 (ISA/JP)</b>	<b>特許庁審査官    郡 山    順</b>	